

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭61-275217

⑬ Int. Cl.

A 61 K 31/66  
35/34

識別記号

ADZ

庁内整理番号

7252-4C  
7138-4C

⑭ 公開 昭和61年(1986)12月5日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全3頁)

⑮ 発明の名称 グラム陰性桿菌感染症防御剤

⑯ 特 願 昭60-114331

⑰ 出 願 昭60(1985)5月29日

⑱ 発 明 者 横 倉 輝 男 東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤクルト本社内  
 ⑲ 発 明 者 瀬 戸 山 保 東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤクルト本社内  
 ⑳ 発 明 者 野 本 康 二 東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤクルト本社内  
 ㉑ 出 願 人 株式会社ヤクルト本社 東京都港区東新橋1丁目1番19号  
 ㉒ 代 理 人 弁理士 板 井 一 郎

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

グラム陰性桿菌感染症防御剤

## 2. 特許請求の範囲

- (1) リボタイコ酸、ノイコ酸またはこれらの両方を有効成分として含有することを特徴とするグラム陰性桿菌感染症防御剤。
- (2) リボタイコ酸およびノイコ酸が乳酸桿菌の菌体より得られたものである特許請求の範囲第1項記載の感染症防御剤。
- (3) 乳酸桿菌がラクトバチルス・カゼイ YIT-9018 またはラクトバチルス・ファージンタム YIT-0159 である特許請求の範囲第2項記載の感染症防御剤。

## 3. 発明の詳細な説明

## 産業上の利用分野

本発明は、グラム陰性桿菌感染症たとえば大腸菌感染症や緑膿菌感染症等の予防および治療に有効な薬剤に関するものである。

## 従来の技術

大腸菌や緑膿菌のようなグラム陰性桿菌は免疫機能の低下

した宿主に感染し易く、その感染は重大な障害をもたらす。

グラム陰性桿菌の感染を防御する手段としては、従来、抗生物質を利用する方法があるが、抗生物質は、毒性が強く副作用を伴うという問題がある。一方、宿主の防御機能を充満させる因子により上記感染症を防御しようとする試みもあるが、有効なものはいまだ見られていない。

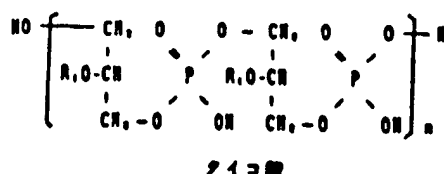
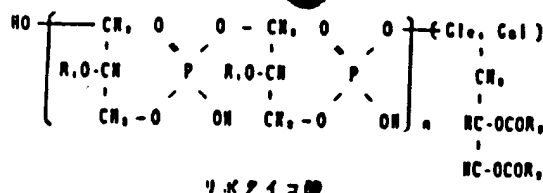
## 発明が解決しようとする問題点

本発明の目的は、上記抗生物質のような欠点のないグラム陰性桿菌感染症防御剤を提供することにある。

## 問題点を解決するための手段

本発明が提供するグラム陰性桿菌感染症防御剤は、リボタイコ酸、ノイコ酸またはこれらの両方を含有し、これら有効成分が多形核白血球を活性化し、活性化された白血球がグラム陰性桿菌の増殖を防ぐ作用により、グラム陰性桿菌感染症の防御を行うものである。

リボタイコ酸およびノイコ酸は、それぞれグラム陽性細菌の細胞膜および細胞壁を構成する物質であって、下記のように、ポリグリセロールリン酸を骨格とする高分子量化合物である。



但し両式において  $R_1 = H, Cl$  または  $Cl$

$R_2 = \text{アルキル基}$

なリボタイコ酸には上記ポリグリセロールリン酸型のもののほかにポリリビトールリン酸型のものも存在することが知られているが、本発明においてタイコ酸とはポリグリセロールリン酸型のものを意味する。

リボタイコ酸およびタイコ酸は、スタフィロコッカス、ストレプトコッカス、ラクトバチルスなど各種グラム陽性細菌菌体より採取することができるが、本発明のグラム陽性細菌感染防御剤のためのものとして特に好ましいのは、乳酸桿

菌のものでもよく、またゲルろ過等の手段により各成分に分離されたものであってもよい。

リボタイコ酸およびタイコ酸は化学的にはポリグリセロールリン酸を骨格とする比較的安定な物質であるから、その製剤化に特に困難はなく、無菌的に精製した粉末を常法により注射剤もしくは注射液のような液体制剤とすればよい。

投与量は、成人1日当り50～500mg程度が適当である。

#### 実施例

乳酸桿菌・LC9018をRogosa 培地で培養し、培養物から分離した菌体を100℃で30分間加熱処理した後、凍結乾燥した。得られた乾燥菌体粉末5gを125mlの精製水に懸濁させ、同量の95%フェノールを加えてから4℃で2時間攪拌した。次いで遠心分離により水層、フェノール層および菌体残渣に分け、水層を分取した。フェノール層および菌体残渣には125mlの精製水を加えて再度攪拌と遠心分離を行なった。得られた水層とさきに得られた水層とを合せ、脱イオン水に対して透析したのちRNase-T-1により核酸を分解し、再度冷フェノール抽出と透析を繰返してから凍結乾燥した。

得られた凍結乾燥物75mgを0.2M酢酸アンモニウム溶

液より得られるものである。すなわち、リボタイコ酸およびタイコ酸は、上記一般式の範囲内で、その由来により分子量や組成を異にし、それに伴いグラム陽性細菌感染防御作用にも若干の相違が認められるが、乳酸桿菌からのものはとりわけすぐれた作用を示すので好ましい。特にすぐれた性能を示すものとして推薦されるのは、ラクトバチルス・カゼイ YIT-9018 (農工研菌第865号; 以下LC9018という) またはラクトバチルス・ファージノタム YIT-0159 (農工研菌第8244号; 以下LF0159という) より得られたリボタイコ酸およびタイコ酸である。

本発明のグラム陽性細菌感染防御剤に用いるリボタイコ酸およびタイコ酸を乳酸桿菌より得る方法は任意であるが、代表的な方法を示せば、Knox らの方法 (Bacteriological Reviews Vol.37, 221, 1972) がある。この方法は、凍結乾燥菌体を水-フェノール混合液で処理し、処理後の液を遠心分離して得られる水層よりリボタイコ酸およびタイコ酸を含む抽出物を得、これを精製するものである。

本発明のグラム陽性細菌感染防御剤のためのリボタイコ酸およびタイコ酸は、上述のようにして得られる精製の、または精製された、リボタイコ酸およびタイコ酸の混合物のま

だに溶解し、Sephacryl S-300でゲルろ過を行い、糖とリン酸の反応がある画分A (分子量約30万) および画分B (分子量約2万) の二つの画分を採取した。両画分はそれぞれ精製水で透析を行なった後、凍結乾燥を行い、0.02Mトリス塩酸バッファー (pH 7.6) 5mlに溶解し、あらかじめ同バッファーで平衡化しておいたDEAE Sepharose CL-4Bにのせ、同バッファーを150ml流し、常通り画分を集めた後、NaCl溶液を濃度0～1Mの直線グラジエントでカラム吸着物質の溶出を行い、溶出液を5mlずつ集め、糖とリン酸の反応がある画分A-1および画分B-1を採取した。両画分はそれぞれ精製水で透析を行なった後、凍結乾燥し、A-1画分約7mgとB-1画分約5mgを得た。

上記と同様の試料調製を、乳酸桿菌・LF0159について行い、ほぼ同様の結果を得た。

二つの乳酸桿菌から得られたA-1およびB-1の両画分は、それぞれリン酸、グリセロール、脂肪酸および中性糖の定量を行い、次表のような組成 (リンを1とするモル比) のリボタイコ酸 (LTA) およびタイコ酸 (TA) であることを確認した。

	LC9018由来 A-1(LTA) B-1(TA)		LF0159由来 A-1(LTA) B-1(TA)	
リン	1.00	1.00	1.00	1.00
グリセロール	1.13	1.11	1.09	1.10
D-グルコース	0.25	0.09	0.09	0.04
D-ガラクトース	0.13	0.04	0.05	0.02
脂肪酸エステル	0.05	-	0.05	-
分子量	約30万	約2万	約30万	約2万

次に各リボタイコ酸およびタイコ酸のグラム陰性桿菌感染症予防作用を次の方法で試験した。まず7~9週令のC57BL/6雄マウスの腹腔内に試料1mgを、生理食塩水溶液の形で投与し、5日後に、 $1.4 \times 10^8$ 個のグラム陰性桿菌(結核菌・KC-2株または大腸菌・E77156株)を腹腔内に投与する。その後のマウスの生死を2週間観察し、細菌投与群の最終生存率を対照群(生理食塩水を投与)のそれと比較することにより感染抵抗性増進効果を判定する。

その結果は次表のとおりで、リボタイコ酸またはタイコ酸を投与しておいたマウスはいずれもグラム陰性桿菌の感染に対する強い抵抗性を示した。

投与物質 由来	種類	生存率	
		結核菌投与群	大腸菌投与群
LC9018	リボタイコ酸	4/6	3/6
・	タイコ酸	5/6	5/6
LF0159	リボタイコ酸	3/6	3/6
・	タイコ酸	5/6	4/6
なし(対照群)		0/7	0/7

次に、上記タイコ酸およびリボタイコ酸について、Litchfield-Wilcoxon 法による急性毒性試験を行なった(体重20~25gのICR系マウスを1群20匹使用)。その結果、タイコ酸もリボタイコ酸も、LD<sub>50</sub>は腹腔内投与で400mg/Kg以上、腹腔内投与で800mg/Kg以上、皮下投与で1000mg/Kg以上であり、きわめて毒性が低いことが確認された。

#### 発明の効果

本発明によるグラム陰性桿菌感染症予防剤は、上記実施例の試験結果が示すように、従来普通に使われている抗生物質に比べると毒性が低く、継続投与しても副作用が少ないものであるから、グラム陰性桿菌感染症の予防および治療にきわめて有効なものである。

代理人 弁理士 板井 一 昭

#### 手 続 補 正 書

昭和60年9月30日

特許庁長官 宇賀 道 郎 殿

#### 1. 事件の表示

昭和60年特許願第114331号

#### 2. 発明の名称

グラム陰性桿菌感染症予防剤

#### 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

(688) 株式会社ヤクルト本社

#### 4. 代理人

〒107 東京都港区北青山 3-6-18

共同ビル 7 階 (電話 400-4422)

(6742) 弁理士 板 井 一 昭



#### 5. 補正命令の日付 自 記

#### 6. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄



#### 7. 補正の内容

- (1) 第4頁第7~8行、第5頁第9行、第7頁第1行および第8頁第3行の「LC9018」を「YIT9018」と訂正する。
- (2) 第4頁第9行、第6頁第13行、第7頁第1行および第8頁第5行の「LF0159」を「YIT0159」と訂正する。